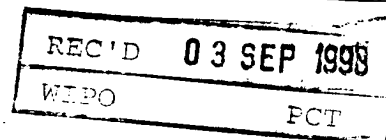


EP 98,04612

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



PRIORITY DOCUMENT

Bescheinigung

Die Studiengesellschaft Kohle mbH in Mülheim an der Ruhr/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung und Identifi-
zierung von neuen Hydrolasen mit ver-
besserten Eigenschaften"

am 25. Juli 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wie-
dergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmel-
dung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die
Symbole C 12 N, C 12 P und C 12 Q der Internationalen Pa-
tentklassifikation erhalten.

München, den 5. August 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Keller

Aktenzeichen: 197 31 990.4

Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von neuen Hydrolasen mit verbesserten Eigenschaften

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.

Stand der Technik:

Hydrolasen gehören zu den am weitesten verbreiteten Enzymen in der organischen Synthese. Als Untergruppe der Hydrolasen katalysieren insbesondere Esterasen und Lipasen eine Vielzahl von Reaktionen wie z.B. die Hydrolyse von Carbonsäureestern, oder die Synthese von Estern bzw. Umesterungen in organischen Lösungsmitteln. Ihre hohe Stereoselektivität, Stabilität und gute Verfügbarkeit machen sie für zahlreiche industrielle Prozesse interessant. So werden z.B. Lipasen bereits industriell zur Racematspaltung von chiralen Alkoholen, Säuren oder Aminen eingesetzt, für die Darstellung enantiomerenreiner Arzneimittel, Naturstoffe, Pflanzenschutzmittel oder hochwertiger Fette und Öle (K.Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 2. Aufl. 1995). Dennoch läßt sich die Enantioselektivität einer Lipase bzw. Esterase gegenüber einem gegebenen Substrat nicht mit Sicherheit vorhersagen und in vielen Fällen verlaufen die Umsetzungen nur mit mäßigen optischen Ausbeuten. Es besteht daher ein Bedarf nach einem Verfahren zur Herstellung von Hydrolasen, das eine gezielte Optimierung der Enantioselektivität hinsichtlich eines gewünschten Produktes und der speziellen Prozeßbedingungen wie Temperatur und Lösungsmittel ermöglicht. Mit Hilfe der heute gebräuchlichen molekularbiologischen Methode der *in vitro*-Mutagenese ließen sich zwar Effekte auf die Enantioselektivität von Lipasen studieren (K.Hult, M. Holmquist, M. Martinelle, *European Symposium on Biocatalysis*, Graz, 1993, Abstracts, L-4), es konnte jedoch keine

Optimierung hinsichtlich eines bestimmten Substrates erreicht werden, die zu einem organisch-synthetisch nutzbaren Enzym geführt hat.

Zu den bedeutendsten Einsatzmöglichkeiten der Gentechnik gehört das Proteindesign, bei dem auf der Grundlage bekannter Strukturdaten mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese basenspezifisch Mutationen in die Gensequenz des entsprechenden Proteins eingeführt werden. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren ließen sich auf diese Weise schon Enzyme mit verbesserter katalytischer Aktivität oder Stabilität herstellen (A. Shaw, R. Bott, *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, 6, 546). Diese Technik, die sogenannte oligonucleotidgerichtete (*oligonucleotide-directed*) oder gezielte Mutagenese (*site-directed mutagenesis*), beruht auf dem Ersatz eines kurzen Sequenzabschnitts des Gens für das natürlich vorkommende Enzym (Wildtyp) durch ein synthetisch mutagenisiertes Oligonucleotid. Nach anschließender Expression des Gens erhält man eine Enzym-Mutante, die vorteilhafte Eigenschaften aufweisen kann. In einem davon abgeleiteten Verfahren, der sogenannten Kassettenmutagenese (*cassette mutagenesis*), werden Oligonucleotide mit partiell randomisierten Sequenzen eingesetzt. Dadurch erhält man eine begrenzt große Bibliothek von Mutanten, die dann hinsichtlich ihrer Eigenschaften getestet werden kann.

Trotz der Vorteile dieser etablierten Methoden eignen sie sich nur schlecht für die schrittweise Optimierung eines Enzyms, bzw. zur Erzeugung von Enzymen mit neuen Eigenschaften. Das bis heute unvollständige Verständnis der Gesetzmäßigkeiten der Proteinfaltung und der Struktur-Funktions-Beziehung bei Proteinen ist die Hauptursache für das Scheitern vieler Projekte auf dem Gebiet des sogenannten rationalen Proteindesigns. Zudem ist ein schrittweiser Optimierungsprozeß nach der klassischen Methode relativ arbeitsaufwendig und garantiert keine signifikante Verbesserung der Enzymeigenschaften *per se*.

In jüngster Zeit wurden neue molekularbiologische Methoden zur Mutagenese beschrieben, die auf der literaturbekannten Polymerase-Kettenreaktion (R.K. Saiki, S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn,

H.A. Erlich, N. Arnheim, *Science*, **1985**, 230, 1350) beruhen (D.W. Leung, E. Chen, D.V. Goeddel, *Technique*, **1989**, 1, 11 und W. P.C. Stemmer, A. Crameri, PCT WO 95/22625). Anstelle der gezielten Mutagenese werden hierbei kombinatorische Methoden zur Erzeugung umfangreicher Mutantenbibliotheken eingesetzt, die nachfolgend mit Hilfe geeigneter Screeningverfahren nach Mutanten mit positiven Eigenschaften durchsucht werden. Dabei werden die in der Natur vorkommenden evolutiven Prozesse der Replikation bzw. Rekombination, der Mutation und Selektion auf molekularer Ebene nachgeahmt. Diese als *in vitro*-Evolution (oder *directed evolution*) beschriebene Methode hat sich bereits in einigen Fällen als brauchbare Methode zur Gewinnung neuer Biokatalysatoren bewährt (W.P.C. Stemmer, *Nature*, **1994**, 370, 389 und F.H. Arnold, *Chemical Engineering Science*, **1996**, 51, 5091).

Trotz der erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet läßt sich dieses Verfahren bisher nicht generell auf alle Enzymklassen übertragen, da es meist an geeigneten Testmethoden zur Identifizierung von Mutanten mit positiven Eigenschaften fehlt. Diese sind aber zwingend erforderlich angesichts der großen Anzahl von mutierten Enzymvarianten, die bei der Erzeugung kombinatorischer Mutantenbibliotheken zu erwarten sind. Insbesondere im Fall der für industrielle Prozesse interessanten Lipasen ist es bisher nicht gelungen, Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität mit den Methoden der *in vitro*-Evolution zu erzeugen, weil ein effizientes Screening-Verfahren zum Test auf Enantioselektivität bis heute nicht existiert. Die klassische Methode zur Bestimmung der Enantioselektivität einer Lipase- bzw. Esterase-katalysierten Umsetzung beruht auf der flüssig-, bzw. gaschromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte und Edukte unter Verwendung von chiral modifizierten, stationären Phasen. Diese Methode ist jedoch aufgrund des enormen Probenaufkommens im Zuge des Screenings von umfangreichen Mutantenbibliotheken ungeeignet, da chromatographische Trennungen mit chiral modifizierten Säulen zeitaufwendig sind und nur nacheinander durchgeführt werden können. Ein weiteres bisher ungelöstes Problem betrifft die häufig zu beobachtende Schwierigkeit, funktionelle Lipasen bzw. Esterasen in Wirtsorganismen mit genügend hoher Aktivitäts-

Ausbeute zu exprimieren. Dies ist jedoch für ein leistungsfähiges Screeningsystem unverzichtbar, da zu geringe Enzym-Aktivitäten bei der Bestimmung der Enantioselektivität aufgrund der begrenzten Empfindlichkeit eines Testsystems nur schwer nachzuweisen sind.

Gegenstand der Erfindung:

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Herstellung von mutierten Hydrolasen, insbesondere Lipasen bzw. Esterasen, mit verbesserter Stereo-, bzw. Regioselektivität, katalytischer Aktivität und Stabilität gegenüber gegebenen Substraten (z.B. Carbonsäuren, Alkoholen, Aminen sowie deren Derivaten) zu entwickeln, das zudem eine schnelle Identifizierung positiver Mutanten aus umfangreichen Mutantenbibliotheken ermöglicht, sowie die Verwendung der so hergestellten Enzyme bei der Racematspaltung von chiralen Alkoholen, Säuren und Aminen sowie deren Derivaten.

Beschreibung der Erfindung:

Die Herstellung der neuen Biokatalysatoren beginnt in der Regel mit der Isolierung eines Lipase- bzw. Esterase-Gens aus dem Ursprungsorganismus. Hierfür kommen alle mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Organismen in Frage, die Träger eines Lipase- bzw. Esterase-Gens sind. Die Genisolierung kann nach den literaturbekannten Methoden vorgenommen werden (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York). In der Regel wird dazu die genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen fragmentiert und die erhaltenen Genfragmente in einem Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) kloniert. Unter Verwendung von Oligonucleotiden, die sequenzhomolog zu einem Abschnitt des Lipase- bzw. Esterase-Gens sind, wird dann in Hybridisierungsexperimenten das Gen in der Genbank identifiziert und nachfolgend isoliert.

Überraschend wurde im Rahmen der Erfindung gefunden, daß durch eine modifizierte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Veränderung bestimmter Reaktionsparameter natürlich vorkommende Hydrolasegene derart mutagenisiert werden können, daß eine umfangreiche Mutantenbibliothek erhalten wird, die mit Hilfe eines neuartigen Testverfahrens nach Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität durchsucht werden kann.

Die Neuartigkeit des Verfahrens besteht darin, daß ausgehend von einem natürlich vorkommenden Lipase- bzw. Esterase-Gen (dem sogenannten Wildtyp-Gen) unter Verwendung einer modifizierten PCR (im folgenden als *mutagenisierende PCR* bezeichnet) eine umfangreiche, randomisierte Mutantenbibliothek angelegt werden kann. Dabei wurde gefunden, daß durch Veränderung der PCR-Reaktionskomponenten die Mutationsfrequenz während der PCR gezielt eingestellt werden kann. Durch die Variation der Mg^{2+} - und/oder der Desoxynucleotid-Konzentrationen und/oder der Zugabe von Mn^{2+} -Ionen läßt sich die Anzahl der Mutationen im betrachteten Lipase-Gen (Mutationsfrequenz) steuern. Vorzugsweise werden hierzu folgende Konzentrationen in Abhängigkeit der verwendeten DNA-Polymerase benutzt:

Mg^{2+} : 1,5 mM - 8,0 mM

dNTP : 0,05 mM - 1,0 mM

Mn^{2+} : 0,0 mM - 3,0 mM

Außerdem wurde gefunden, daß die Zyklenzahl der PCR-Reaktion mit der Anzahl der Mutationen korreliert: je höher die Zyklenzahl gewählt wird, desto höher die Gesamtanzahl der Mutationen. Mit Hilfe dieses Parameters läßt sich die Diversität der Mutantenbibliothek einstellen.

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenz werden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. Durch Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der Sequenz des Wildtyp-Gens läßt sich die Mutationsfrequenz bestimmen.

Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der Konzentration obengenannter PCR-Reaktionskomponenten bei der Amplifizierung des Lipase-Gens aus *P. aeruginosa* (*lipA*).

Tabelle 1

Versuch	Mg ²⁺ (mM)	Mn ²⁺ (mM)	dATP/ dGTP (mM)	dTTP/ dCTP (mM)	Mutations- frequenz (Mutationen /1000 bp ¹⁾)
1	6,1	-	0,2	0,2	1-2
2	7,0	0,5	0,2	1,0	15-20

¹⁾bp = Basenpaare

Aufgrund der Resultate der Sequenzierung ergibt sich weiterhin, daß als Mutationsarten Transitionen und Transversionen statistisch in etwa gleicher Häufigkeit auftreten. Deletionen und Insertionen werden hingegen nur selten beobachtet. Zudem liegen die Mutationen über das ganze Lipase-Gen gleich verteilt vor. Somit läßt sich mit der beschriebenen Methode eine Mutantenbank mit statistisch gleichverteilten Mutationen erzeugen. Als vorteilhaft hat sich eine Mutationsfrequenz von 1-2 Mutationen / Hydrolasegen erwiesen. Dadurch wird verhindert, daß beim Auftreten mehrerer Mutationen pro Hydrolasegen eine negative Mutation eine Mutation mit positivem Effekt maskiert. Um eine komplette Mutantenbibliothek mit jeweils einem Aminosäureaustausch pro Enzymmolekül zu erhalten, müssen bei einer Lipase, die aus 285 Aminosäuren (hier: Lipase aus *P. aeruginosa*) besteht, theoretisch 5415 Mutanten erzeugt werden. Dieser Wert ergibt sich gemäß folgendem Algorithmus:

$$N = 19 \times M \times 285! / [(285 - M)! \times M!]$$

mit N = Anzahl der Mutanten und M = Anzahl der Aminosäure-Austausche pro Lipase-Molekül. Im Rahmen der Erfindung konnte überraschend gezeigt werden, daß bereits bei weitaus geringeren Bibliotheksgrößen positive Mutanten gefunden werden, wobei mit einer Mutationsfrequenz von 1-2 gearbeitet wurde.

Die nach dem beschriebenen Verfahren erhaltenen mutierten Lipase- bzw. Esterase-Gene werden in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert und dann nach einem Wirtsorganismus, z.B. *E. coli*, transformiert. Anschließend werden die transformierten Zellen auf Agarplatten ausgestrichen und kultiviert. Sofern eine genügend hohe Expressionsrate vorliegt, können die erhaltenen Kolonien in mit Flüssigmedium versehene Mikrotiterplatten überführt werden und nach dem Anwachsen direkt zum Screeningtest eingesetzt werden. Für den Fall, daß bei der Expression des Lipasegens nur wenig Enzym gebildet wird, bzw. das Genprodukt im verwendeten Wirtsorganismus nicht korrekt gefaltet (Inklusionskörper) oder unvollständig in das Kulturmedium sekretiert wird, ist es vorteilhaft, die mutierten Gene in einen anderen Wirtsorganismus, vorzugsweise den Ursprungsorganismus, umzuklonieren.

Um genügend hohe Enzymaktivitäten zu erhalten, werden die einzelnen Bakterienklone, die ein mutiertes Lipase- bzw. Esterase-Gen enthalten, von den Agarplatten in die Tröge von handelsüblichen Mikrotiterplatten überführt und dort in Flüssigmedium angezogen. Vorzugsweise werden hierfür Mikrotiterplatten mit 96 Trögen pro Platte benutzt. Das Wachstum der Bakterien kann durch Messung der Zelldichte (OD_{600} -Wert) kontrolliert werden. Es ist vorteilhaft, parallel eine zweite Mikrotiterplatte auf diese Weise anzupflanzen, um so eine Referenz für die spätere Identifizierung positiver Klone zu haben. Diese wird zweckmäßigerweise nach dem Anwachsen der Bakterien mit Glycerin versetzt und bis zur Identifizierung bei -80°C gelagert. Sofern die Bakterien das Enzym in den Extrazellularraum sekretieren (z.B. bei der Lipase aus *P. aeruginosa*), werden die Zellen in den Mikrotiterplatten abzentrifugiert und der Überstand mit der Lipase- bzw. Esterase-Aktivität zum Screeningtest eingesetzt. Für den Fall, daß die Bakterien (z.B. *E. coli*) das Enzym in das Periplasma sezernieren, muß vorher eine Zellwand-Lyse durchgeführt werden, wobei literaturbekannte Methoden wie z.B. eine Lysozym-Behandlung angewendet werden können.

Durch Anzucht der zugehörigen Klone von der Referenzplatte läßt sich ausreichend Plasmid-DNA isolieren, die zur Charakterisierung des

mutierten Lipase- bzw. Esterase-Gens eingesetzt werden kann. Durch Sequenzierung werden die Mutationen im Gen lokalisiert. Ein Vorteil der Erfindung betrifft die Tatsache, daß auch ohne Kenntnisse der exakten Position der Mutationen in einem positiven Klon, das mutierte Gen in weiteren Mutations-Zyklen nach dem beschriebenen Verfahren hinsichtlich seiner Eigenschaften weiter optimiert werden kann. Dazu wird das isolierte Lipase- bzw. Esterase-Gen erneut in einer nach den oben angegebenen Bedingungen modifizierten PCR (*mutagenisierende PCR*) eingesetzt. Diese Prozedur kann so oft wiederholt werden, bis die Eigenschaften der Lipase- bzw. Esterase-Mutante den Anforderungen an die stereoselektive Umsetzung genügen.

Zur weiteren Optimierung der identifizierten positiven Mutanten läßt sich das beschriebene Verfahren dergestalt erweitern, daß die DNA mehrerer Positiv-Mutanten zunächst fragmentiert wird und dann in einem kombinatorischen Prozeß nach W.P.C. Stemmer (*Nature*, 1994, 370, 389) zu funktionalen Lipase- bzw. Esterase-Genen reassembliert werden kann. Die so erhaltene *in vitro*-Rekombinantenbibliothek wird anschließend exprimiert und die rekombinanten Genprodukte mit Hilfe der erfindungsgemäßen Testverfahren auf verbesserte Enantioselektivität hin untersucht. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß sich aufgrund der Rekombination die positiven Eigenschaften verschiedener Lipase- bzw. Esterase-Mutanten in einem neuen rekombinanten Gen addieren können, was letztlich zu einer weiteren Verbesserung der Lipase bzw. Esterase führen kann. Der Ablauf des beschriebenen Verfahrens ist wie folgt:

Die Lipase- bzw. Esterase-Gene werden zunächst mit Hilfe des Enzyms DNase I (z.B. aus Rinder-Pankreas) in Fragmente gespalten mit einer vorzugsweisen Länge zwischen 25 Bp und 100 Bp. Die Größe der Fragmente läßt sich durch Auftrennung mittels einer Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich mit entsprechenden DNA-Längenmarkern kontrollieren. Die so erhaltenen DNA-Fragmente werden aufgereinigt, um sie von anhaftender DNase zu befreien. Die *in vitro*-Rekombination wird unter den Bedingungen einer konventionellen PCR

durchgeführt, wobei keine PCR-Primer zugesetzt werden. Analog zur konventionellen PCR unterteilt sich ein Zyklus in drei Schritte: a) Denaturierung, b) Annealing und c) Elongation. Während des Annealings kommt es zu einer Hybridisierung sequenzhomologer Fragmente, die aus unterschiedlichen mutierten Lipase- bzw. Esterase-Genen stammen können. Im nachfolgenden Elongationsschritt werden die Stränge durch die DNA-Polymerase vervollständigt, so daß schließlich neue, rekombinante Lipasegene erhalten werden. Die optimale Anzahl der Zyklen wird in einem Vorversuch bestimmt. Dazu trennt man nach jeweils 5 Zyklen eine geringe Probe des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese auf und ermittelt daraus den Zyklus, bei dem das Maximum der Größenverteilung der Rekombinanten im Bereich der Größe des Enzym-Gens liegt. Vorzugsweise wird eine Zyklenzahl zwischen 30 und 45 gewählt. Die erhaltene Bande im Agarosegel, die der Größe nach dem Lipase- bzw. Esterase-Gen entspricht, wird aufgereinigt und durch eine konventionelle PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und nach Ligation in einen geeigneten Vektor (Plasmid) nach *E. coli* transformiert. Wie bereits im Abschnitt über die *mutagenisierende PCR* besprochen, kann es erforderlich sein, in einen anderen Wirtsorganismus umzuklonieren, falls die Lipaseaktivität nach der Expression in *E. coli* zu gering sein sollte. Die erhaltenen Rekombinanten werden für den Test auf Enantioselektivität in Mikrotiterplatten angezogen.

In einer Variante der Erfindung können die beschriebenen Verfahren der *mutagenisierenden PCR* und der *in vitro*-Rekombination zur Erzeugung von Mutations- bzw. Rekombinantenbibliotheken nacheinander in beliebiger Reihenfolge und Häufigkeit durchgeführt bzw. wiederholt werden, um die Enantioselektivität der Lipase bzw. Esterase zu optimieren. Vorzugsweise wird zu Beginn mindestens ein Mutationszyklus mittels *mutagenisierender PCR* durchgeführt. Im Anschluß daran kann dann ein *in vitro*-Rekombinations-Zyklus erfolgen, wobei die jeweils besten positiven Mutantenklone eingesetzt werden. Durch Kontrolle der Enantioselektivität der erhaltenen Enzym-Mutanten läßt sich der Optimierungsprozeß verfolgen.

In einer weiteren Variante der Erfindung können positive Lipase- bzw. Esterase-Mutanten, die durch das Screening von Mutanten- oder Rekombinantenbibliotheken identifiziert wurden, mit Hilfe der klassischen gerichteten Mutagenese bzw. der Kassetten-Mutagenese weiter optimiert werden. Dazu wird die Mutation in dem Lipase- bzw. Esterase-Gen zunächst durch Sequenzierung lokalisiert. Anschließend wird dieses Gen mit Hilfe "gewobelter" Primer an den Codons, die für positive Mutanten codieren, erneut mutagenisiert. Die so erhaltene begrenzt große Mutantenbibliothek kann dann exprimiert werden und nach verbesserter Enantioselektivität gescreent werden.

In einer Variante des beschriebenen Verfahrens wird das Lipase- bzw. Esterase-Gen des Wildtyp-Enzyms zusammen mit den gefundenen Positiv-Mutanten zur *in vitro*-Rekombination eingesetzt. Dadurch kann es zu Rückkreuzungen kommen, bei denen Mutationen mit neutralen oder negativen Eigenschaften eliminiert werden können. Die erhaltene Rekombinantenbibliothek kann nach der Expression auf verbesserte Enantioselektivität untersucht werden.

In einer weiteren Variante des beschriebenen Verfahrens werden Hydrolasegene aus unterschiedlichen Organismen zur *in vitro*-Rekombination eingesetzt, sofern sie eine genügende Sequenzhomologie zu dem ursprünglich eingesetzten Hydrolasegen besitzen.

In einer Variante des Verfahrens wird die *in vitro*-Rekombination unter den Bedingungen der beschriebenen modifizierten PCR durchgeführt. Dazu wird die Konzentration der Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Ionen sowie die der Desoxynucleotide (dNTPs) verändert, um gezielt die Mutationsfrequenz während der *in vitro*-Rekombination zu einzustellen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Testverfahren, die die Identifizierung von Enzym-Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität oder Regioselektivität aus umfangreichen Mutantenbibliotheken ermöglichen. Dazu werden zwei gleiche Aliquots des enzymhaltigen Überstandes nach der Zentrifugation der Bakterienzellen in jeweils

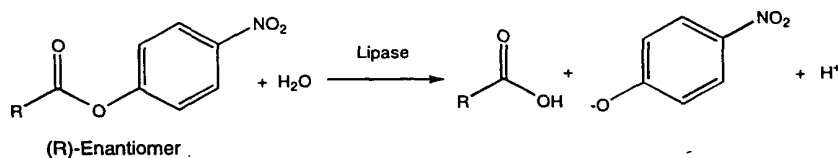
benachbarte Tröge einer neuen Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe der beiden enantiomeren Substrate in jeweils einen der Tröge wird die Aktivität der Lipase bzw. Esterase spektrophotometrisch bestimmt. Die Messungen werden in einem handelsüblichen Spektralphotometer für Mikrotiterplatten durchgeführt. Dadurch wird ein hoher Probendurchsatz ermöglicht. Die Wahl des Substrates richtet sich nach der Art der chiralen Verbindung, für die eine Optimierung der Lipase bzw. Esterase vorgenommen werden soll. Insbesondere eignet sich das Verfahren für chirale Carbonsäuren, Alkohole und Amine.

Im Fall von chiralen Carbonsäuren bzw. chiralen COOH-funktionalisierten Verbindungen werden die beiden entsprechenden p-Nitrophenylester der (R)- bzw. (S)-Säure als Testsubstrat eingesetzt. Formel 1 zeigt das Prinzip des Testverfahrens, wobei R einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum symbolisiert.

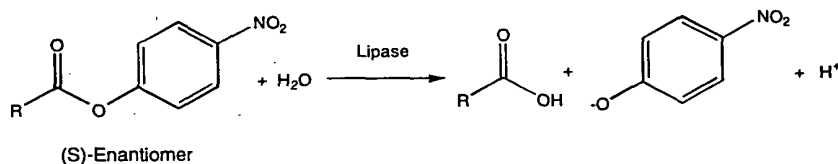
Formel 1

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Carbonsäuren bzw. COOH-funktionalisierten Verbindungen

Reaktion 1:



Reaktion 2:



Aufgrund der hohen Extinktion des bei der Hydrolase-katalysierten Esterhydrolyse freigesetzten p-Nitrophenolat-Anions ($\lambda_{\max}=405 \text{ nm}$,

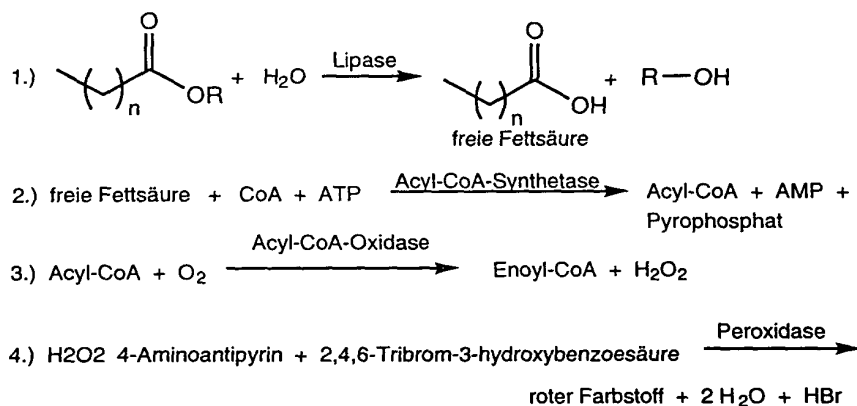
$E_{\max}=14.000$) ergibt sich ein hochempfindliches Testverfahren, mit dem eine Aktivitätsbestimmung auch bei niedrigen Substratkonzentrationen durchgeführt werden kann. Die Enantioselektivität der Hydrolase-Mutanten läßt sich aus dem Quotienten der Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ für den (R)- und den (S)-Ester mit ausreichender Genauigkeit bestimmen. Da die beiden Testansätze jeweils nur ein Enantiomer enthalten (entweder den R- oder S-Ester), muß bei der Bestimmung der Enantioselektivität die fehlende Konkurrenzreaktion mit dem anderen Enantiomer berücksichtigt werden. Dieser kinetische Effekt kann zwar zur Berechnung fehlerbehafteter Enantioselektivitäten führen, es hat sich jedoch gezeigt, daß die nach der vorgestellten Methode erhaltenen apparenten Enantioselektivitäten (E_{app}) genügend Aussagekraft hinsichtlich der Enantioselektivität der mutierten Lipasen haben. E_{app} ergibt sich als $V_{app(R)} / V_{app(S)}$. Ein weiterer Vorteil liegt in der einfachen Durchführung und guten Reproduzierbarkeit des Tests, der sich auch für ein Screening mit hohem Probendurchsatz eignet.

Im Fall von chiralen Alkoholen bzw. von chiralen OH-funktionalisierten Verbindungen werden Fettsäureester der beiden enantiomerenreinen Alkohole für den Test auf Stereoselektivität eingesetzt. Die Kettenlänge der Fettsäuren liegt im Bereich von C₂ bis. Als Alkohol-Komponente können primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole sowie deren Derivate mit mindestens einem Asymmetriezentrum eingesetzt werden. Lösungen der Ester der (R)- und (S)-Alkohole werden in jeweils benachbarten Trögen einer Mikrotiterplatte mit Kulturüberständen der Hydrolase-Mutanten hydrolysiert. Die Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ der (R)- und (S)-Ester sind ein Maß für die Enantioselektivität der untersuchten Enzym-Mutante. Die Detektion erfolgt über eine gekoppelte Enzymreaktion (H.U. Bergmeyer, *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1977), bei der die kontinuierliche Freisetzung der Fettsäure verfolgt wird. Der gebildete Farbstoff wird colorimetrisch bei 546 nm ($\epsilon = 19,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Konzentrationen der Enzyme, Cofaktoren und Coenzyme der Hilfsreaktionen 2 und 3 (siehe Formel 2) sowie der Indikatorreaktion 4 müssen so gewählt werden, daß die zu bestimmende Lipase- bzw.

Esterase-katalysierte Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Quotient der Hydrolysegeschwindigkeiten des (R)- und (S)-Esters entspricht der apparenten Enantioselektivität (E_{app}). In einer Variante werden anstelle der enantiomerenreinen Ester die Fettsäureamide chiraler Amine bzw. NH_2 - oder NHR -funktionalisierter Verbindungen eingesetzt. Formel 2 zeigt das Schema des Testsystems.

Formel 2

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Alkoholen; R symbolisiert einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum; Abkürzungen: CoA (Coenzym A), ATP (Adenosin-5'-triphosphat), AMP (Adenosin-5'-monophosphat)

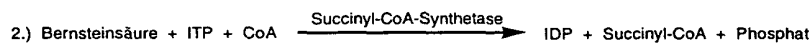
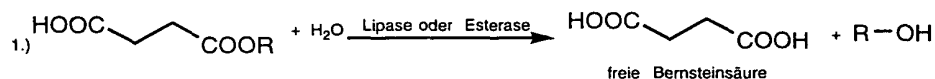


In einer Variante des Verfahrens können anstelle der Fettsäureester bzw. -amide die entsprechenden Ester und Amide der Bernsteinsäure eingesetzt werden. Diese haben gegenüber den Fettsäuren den Vorteil der besseren Löslichkeit in wäßrigen Lösungen bzw. wäßrig-organischen Solventien. Die Messung erfolgt UV-spektrometrisch bei 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Auch bei diesem Testverfahren ist zu beachten, daß die Hydrolase-katalysierte Reaktion 1 geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Quotient der Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ des (R)- und (S)-Esters entspricht der apparenten Enantioselektivität (E_{app}). In einer Variante werden anstelle der enantiomerenreinen Ester die Fettsäureamide chiraler Amine eingesetzt. Als Amin-Komponente können

sowohl primäre als auch sekundäre Amine eingesetzt werden. Das Schema des Testverfahrens ist in Formel 3 wiedergegeben.

Formel 3

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Alkoholen; R symbolisiert einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum; Abkürzungen: CoA (Coenzym A), ITP (Inosin-5'-triphosphat), IDP (Inosin-5'-diphosphat), NADH / NAD⁺ (reduziertes bzw. oxidiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid)



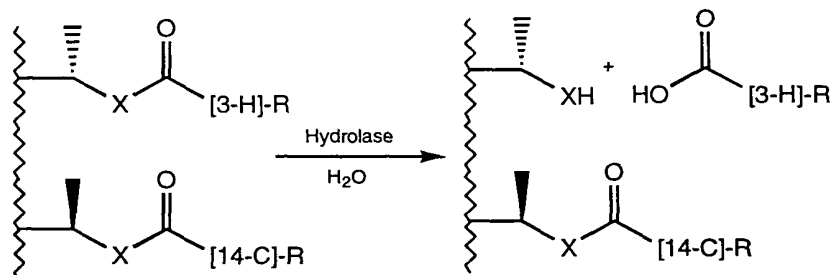
Der Test zur Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität kann weiterhin derart ausgeführt werden, daß beide Stereoisomere im Testansatz enthalten sind. Dadurch kann auf die getrennte Messung des (R)- und (S)-Enantiomers verzichtet werden. Das Testprinzip geht von einer Anbindung eines racemischen Gemisches des chiralen Substrates an einer Festphase aus. Über eine Ester- bzw. Amidbindung an dieser chiralen Verbindung wird ein radioaktiv markierter organischer Rest gebunden. Zwei Fälle lassen sich unterscheiden:

- a) Festphasen-gebundene chirale Carbonsäure: die Carboxylfunktion wird mit einem radioaktiv markierten Alkohol verestert
- b) Festphasen-gebundener chiraler Alkohol oder chirales Amin, bzw. OH- oder NH₂- (NHR-)funktionalisierte Verbindungen: die Hydroxyl- bzw. Aminfunktion wird mit einer radioaktiv markierten Carbonsäure markiert.

Entscheidend ist dabei, daß die beiden Enantiomeren des an der Festphase gebundenen racemischen Gemisches mit unterschiedlichen Isotopen markiert sind. Vorzugsweise werden ^3H und ^{14}C -markierte Verbindungen eingesetzt. Als Festphase können sowohl alle gängigen organischen, funktionalisierten Polymere sowie anorganische, funktionalisierte Träger eingesetzt werden. Vorzugsweise werden Festphasen auf Polystyrol-Basis und Kieselgel-Träger eingesetzt. Anschließend werden die chiralen, radioaktiv markierten Verbindungen an die Festphase gebunden, wobei die Kupplung an die Festphase an die chemische Beschaffenheit des chiralen Substrates angepaßt werden muß. Formel 4 zeigt das Schema der modifizierten Festphase und das Prinzip des Testverfahrens.

Formel 4

Schema des Festphasen-Screeningtests auf Stereoselektivität mit doppelt radioaktiv markiertem Substrat; ($\text{X} = \text{O}, \text{NH}$; R ist ein radioaktiv markierter, organischer Rest)



Etwa gleiche Mengen des so modifizierten Trägers können in kleine Reaktionsgefäße verteilt werden (z.B. in die Tröge von Mikrotiterplatten) und dann mit den Kulturüberständen der Hydrolase-Mutanten versetzt werden. Bei der anschließenden Reaktion werden die radioaktiv markierten Komponenten (Carbonsäure oder Alkohol) von der Festphase hydrolysiert und in das flüssige Medium abgegeben. Ein Aliquot des Mediums wird dann entnommen und in einem Szintillationsmeßgerät auf die Menge an Radioaktivität hin untersucht. Aus dem Verhältnis der beiden unterschiedlichen Isotope zueinander kann der Enantiomerenüberschuß und der Umsatz der Reaktion und somit die Enantioselektivität der

mutierten Esterase bzw. Lipase berechnet werden. Durch Verwendung von regioisomeren Testverbindungen lassen sich die beschriebenen Tests auch zur Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Regioselektivität einsetzen. Anstelle von Hydrolase-Mutanten können auch andere Katalysatoren eingesetzt werden, um die Stereo- oder Regioselektivität zu bestimmen.

Der Test auf Enantioselektivität der nach dem beschriebenen Verfahren hergestellten Hydrolase-Mutanten kann auch durch kapillarelektrophoretische Trennung erfolgen unter Verwendung von chiral modifizierten Kapillaren, die eine direkte Trennung der enantiomeren Substrate bzw. Produkte der Hydrolase-katalysierten Testreaktion ermöglichen. Hierzu können die Testsubstrate als Racemat eingesetzt werden. Die Trennung kann sowohl in Kapillaren erfolgen als auch unter Verwendung von präparierten Mikrochips, die eine elektrophoretische Trennung und Parallelisierung der Analysen zum Zwecke eines hohen Probendurchsatzes ermöglichen. Voraussetzung ist in beiden Fällen, daß die Enantiomeren kapillarelektrophoretisch trennbar sind.

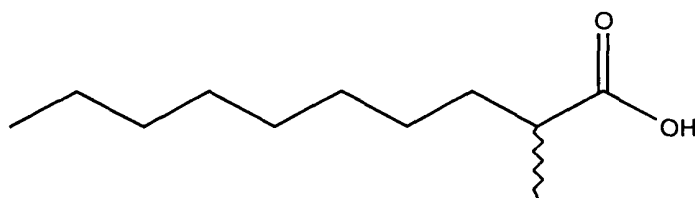
Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt die experimentell erhaltenen Meßkurven zur Bestimmung der apparenten Enantioselektivität (E_{app}) bei der Hydrolyse von R)- bzw. (S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester mit Kulturüberständen der Lipase-Mutanten P1B01-E4, P2B08-H3, P3B13-D10 und der Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa* (die Steigerungen haben die Einheit [mOD/min]).

Fig. 2: Vergleich der DNA-Sequenzen der Lipase-Mutanten P1B01-H1, P1B01-E4, P2B08-H3 und P3B13-D10 mit der Sequenz des Wildtyps (wt) von Lipase aus *P. aeruginosa* (die mutierten Basen relativ zum Wildtyp sind schwarz unterlegt, der Start der reifen Lipase-Mutanten liegt bei AS 163).

Beispiel 1

Im folgenden Beispiel wurde das Gen der Lipase aus *P. aeruginosa* (Isolierung nach K.-E. Jäger, Ruhr-Universität Bochum) für eine Optimierung herangezogen. Das Substrat, auf das hin die Enantioselektivität der Lipase verbessert werden sollte, war (R,S)-2-Methyldecansäure. Es sollte eine Lipase-Mutante entwickelt werden mit einer Präferenz für das (S)-Enantiomer. Der Screening-Test wurde mit (R)- bzw. (S)-2-Methyl-decansäure-p-nitrophenylester durchgeführt.

Formel 5

(R,S)-2-Methyldecansäure

Bakterienstämme*E. coli* JM109:

e14-(McrA), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K-m_K⁺),
supE44, *relA1*, Δ (*lac-proAB*), [F' *tra* Δ 36 *proAB lacI*^q Z Δ M15]
 (Fa. Stratagene)

P. aeruginosa PABST7.1:

lacUV5/lacI^q reguliertes T7-Polymerasegen stabil in das Chromosom des Stamm *P. aeruginosa* PABS integriert, der eine Deletion im Strukturgen der Lipase *lipA* trägt (K.-E. Jaeger *et al. J. Mol. Cat. Part B*, 1997, in press)

Plasmide

- pMut5: *Bam*HI/*Ap*al Fragment (1046 Bp) des *P. aeruginosa* Lipasegens *lipA* im Vektor pBluescript KSII (Fa. Stratagene)
- pUCPL6A: *Bam*HI/*Hind*III Fragment (2,8 Kbp), welches das *P. aeruginosa* Lipase-Operon umfaßt, im Vektor pUCPKS (Watson *et al.*, *Gene* 1996, 172, 163) unter der Kontrolle des T7-Promotors

Kultivierung von Bakterien

E. coli JM109 wird über Nacht (16h) bei 37°C in 5 ml LB Medium auf einem Reagenzglasroller angezogen. Für *P. aeruginosa* PABST7.1 wird dem Medium 1mM IPTG zugesetzt. Für den Screening-Test wird *P. aeruginosa* PABST7.1 in Mikrotiterplatten auf einem Rundschüttler angezogen, wobei das Kulturvolumen 200 µl beträgt und die Inkubation auf 36-48h verlängert wird. Antibiotika werden in folgenden Konzentrationen zugegeben:

E.coli JM109: Ampicillin 100 µg/ml; *P.aeruginosa* PABST7.1: Carbenicillin 200 µg/ml, Tetrazyklin 50 µg/ml

Mutagenisierende PCR

Das Lipasegen *lipA* wird unter Verwendung des durch Endonuclease *Xmn*I linearisierten Plasmids pMut5 als Matrize und folgender PCR-Primer amplifiziert:

A :5'-GCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAA-3';

B :5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA-3'

Nach Reinigung des PCR-Produktes mittels einer Qiagen Qiaquick Column® dient es als Template in einer mutagenen PCR-Reaktion. Die Reaktionsbedingungen sind wie folgt: ein 100 µl Reaktionsvolumen

enthält 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 mM Tris-HCl (pH 8.8); 6,1 mM MgCl_2 ; 6,7 μM EDTA (pH 8.0); 0,2 mM dNTPs; 10 mM Mercaptoethanol; 10 μl DMSO; je 10 pmol der Primer; 0,1 ng Template-DNA und 1U Taq-Polymerase (Goldstar, Fa. Eurogentec). Das Reaktionsvolumen wird mit 100 μl Paraffin überschichtet. Es wurden 10 parallele Reaktionen durchgeführt, die nach Reaktionsende vereinigt wurden. Das Zyklen-Protokoll ist wie folgt: Nach einer 2 min Denaturierung bei 98°C, folgen 25 Zyklen mit 1 min 94°C, 2 min 64°C 1 min 72°C auf einem Robocycler 40 (Fa. Stratagen), gefolgt von einer 7 min Inkubation bei 72°C. Die Taq-Polymerase wird nach der Denaturierung des 1. Zyklus zugesetzt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergibt eine Fehlerrate von ca. 1-2 Basenaustauschen pro 1000 Bp.

Klonierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte werden mit Ethanol gefällt und in A. dest resuspendiert. Nach Restriktion mit *Apal* und *BamHI* wird das entstandene 1046 Bp Fragment mittels einer Qiagen Qiaquick Column® gereinigt und unter Verwendung von T4-DNA Ligase (Fa. MBI Fermentas) für 2h bei RT in den entsprechend vorbereiteten Vektor pUCPL6A ligiert. Das Reaktionsvolumen wird 1:5 verdünnt und in 200 μl kompetenter Zellen von *E. coli* JM109, die nach der Methode von Hanahan (*J. Mol. Biol.* 1983, 166, 557) präpariert werden, transformiert. Dazu werden DNA und Zellen für 1h auf Eis gelagert, 2 min bei 42°C und nach Zugabe von 700 μl LB-Medium 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend auf LB (Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$) Platten ausplattiert. 60 ng des PCR-Produktes, die in die Ligationsreaktion eingesetzt werden, erbringen ca. 1500 Kolonien. Alle Kolonien werden in sterilem LB-Medium resuspendiert, die Plasmid DNA gereinigt und durch Elektroporation nach der Methode von Farinha und Kropinski (*FEMS Microbiol. Lett.* 1990, 70, 221) in *P. aeruginosa* PABST7.1 transformiert. Die 96 Tröge der Mikrotiterplatten werden mit jeweils einer Kolonie inokuliert und wie im Abschnitt "Kultivierung von Bakterien" beschrieben behandelt. Zur Gewinnung des Kulturüberstandes, der anschließend im

Test auf Stereoselektivität eingesetzt wird, werden die Mikrotiterplatten 30 min bei 4000 Upm zentrifugiert.

Test auf Stereoselektivität

Die durch Zentrifugation gewonnenen Lipase-haltigen Kulturüberstände werden in jeweils zwei gleichen Aliquots in benachbarte Tröge einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das Testvolumen beträgt 100 μ l und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 2):

Tabelle 2

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Test auf verbesserte Enantioselektivität von Lipase-Mutanten

(R)-Ansatz	(S)-Ansatz
50 μ l Kulturüberstand	50 μ l Kulturüberstand
40 μ l 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5	40 μ l 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5
10 μ l Substratlösung [10 mg / ml (R)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester in DMF]	10 μ l Substratlösung [10 mg / ml (S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester in DMF]

Nach der Zugabe des Tris/HCl-Puffers zu den Überständen wird die Mikrotiterplatte ca. 5 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wird nach Addition der Substratlösung spektrophotometrisch bei 410 nm und 30 °C kontinuierlich 10 min lang verfolgt. Aus dem linearen Anstieg der Absorptionskurve, die ein Maß für die konstante Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse ist, wird die apparente Enantioselektivität (E_{app}) bestimmt. Dazu werden die gemessenen Steigungen im linearen Bereich der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen des Enantiomerenpaares dividiert und man erhält den Wert für die apparente Enantioselektivität der entsprechenden Lipase-Mutante.

Bestimmung der Stereoselektivität durch Gaschromatographie

Ausgewählte positive Klone werden in 5 ml -Flüssigkulturen (LB-Medium) angezogen und der Lipase-haltige Überstand nach Zentrifugation und Entfernung des Bakterien-Pellets zur Reaktion eingesetzt. Als Substrat werden 100 µl einer Lösung von racemischem (*R,S*)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester (10 mg/ml in Dimethylformamid) eingesetzt. Diese wird mit 700 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Kulturüberstand gestartet und bei 30°C und 1000 rpm in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach 2,5 h werden jeweils 200 µl Proben entnommen und in ein mit 200 µl Dichlormethan gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 25 µl 20 %iger Salzsäure werden Produkte und Edukt extrahiert (Vortex-Schüttler, 1 min). Die organische Phase wird schließlich zur gaschromatographischen Analyse (GC) eingesetzt. Dabei wird eine Trennung der Enantiomere der freien 2-Methyldecansäure erzielt.

Trennbedingungen der GC:

Instrument:	Hewlett Packard 5890
Säule:	25 m 2,6 DM 3 Pent β-CD / 80% SE 54
Detector:	FID
Temperatur:	230°C Inlet; 80-190°C mit 2°C / min
Gas:	0,6 bar H ₂
Probenmenge:	0,1 ml

Ergebnisse (1. Zyklus)

Von ca. 1000 untersuchten Klonen, die durch *mutagenisierende PCR* mit der Ausgangs-DNA (Wildtyp-Gen von Lipase aus *P. aeruginosa*) erhalten wurden, wurden 12 mit verbesserter Enantioselektivität gegenüber dem entsprechenden Wildtyp-Enzym identifiziert. 3 Klone wurden schließlich ausgewählt und deren Enantioselektivität durch GC-Analyse bestimmt.

Tabelle 3

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(1. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nach GC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
Wildtyp	21,8	14,9	1,5	2,4 / 15,3	1,1
P1B01-E4	128,4	43,2	3,0	36,1 / 23,2	2,4
P1B01-F12	78,8	35,7	2,2	14,1 / 30,5	1,4
P1B01-H1	158,7	56,2	2,8	37,6 / 4,5	2,2

¹⁾ $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

²⁾ $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

Die DNA des Klon P1B01-E4 diente als Ausgangspunkt für eine neue PCR-Mutagenisierungsrunde. Dazu wurde das Plasmid pUCPL6A aus dem Klon isoliert und wie oben beschrieben nach *E. coli* JM109 transformiert. Nach Präparation der Plasmid-DNA wurde das 1046 Bp große Fragment durch Restriktion mit *Apal* und *BamHI* und anschließender Reinigung gewonnen und in das entsprechend vorbereitete Plasmid pMut5 ligiert. Nach Transformation und Plasmidisolierung diente dieses Plasmid als template-DNA in einer *mutagenisierenden PCR*-Reaktion unter den oben beschriebenen Bedingungen. Die gewonnene DNA der *mutagenisierenden PCR* diente zur Herstellung einer neuen Mutantenbibliothek (2. Generation).

Ergebnisse (2. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 2. Generation wurden ca. 2200 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurden 10 Mutanten mit einer gegenüber der Mutante P1B01-E4 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. 2 Mutanten (P2B04-G11 und P2B08-H3) wurden per GC-Analyse genauer untersucht.

Tabelle 4

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(2. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) / % Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P2B04-G11	224,9	52,3	4,3	47,8 / 30,0	3,4
P2B08-H3	310,8	67,4	4,6	56,6 / 19,3	4,1

$$1) E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$$

$$2) E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)] \text{ mit } c = \text{Umsatz, } ee_p = \text{ee-Wert des Produktes}$$

Der Klon P2B08-H3 wurde für die nächste Mutationsrunde (3. Generation) eingesetzt.

Ergebnisse (3. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 3. Generation wurden ca. 2400 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurde 1 Mutante (P3B13-D10) mit einer gegenüber der Mutante P2B08-H3 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. Diese wurde durch GC-Analyse weiter untersucht.

Tabelle 5

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(3. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) / % Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P3B13-D10	240,0	35,2	6,9	74,8 / 34,6	10,2

$$1) E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$$

$$2) E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)] \text{ mit } c = \text{Umsatz, } ee_p = \text{ee-Wert des Produktes}$$

Sequenzierung der positiven Mutanten

Durch Sequenzierung der positiven Mutanten konnten die Mutationen in den Lipase-Genen lokalisiert werden (siehe Anhang 2). Nach Zuordnung der Basen-tripletts zu den entsprechenden Aminosäuren ergeben sich gegenüber der Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa* folgende Aminosäure-Austausche :

P1B01-H1:	T103I (Thr ₁₀₃ --> Ile ₁₀₃), S149G (Ser ₁₄₉ --> Gly ₁₄₉)
P1B01-E4:	S149G (Ser ₁₄₉ --> Gly ₁₄₉)
P2B08-H3:	S149G (Ser ₁₄₉ --> Gly ₁₄₉), S155L (Ser ₁₅₅ --> Leu ₁₅₅)

Der Basenaustausch im Gen der Mutante P2B08-3H (C-->T) führt zu keinen Aminosäure-Austausch.

Die Mutanten P1B 01-E4, P2B 08-H3, P3B 13-D10 wurden unter den Bezeichnungen DSM 11 658, DSM 11 659 und DSM 11 659 am 16.07.1997 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, hinterlegt.

Beispiel 2

Die Vorschriften zur Kultivierung der Bakterien, der *mutagenisierenden PCR* sowie des Testverfahrens auf Enantioselektivität sind analog zu Beispiel 1. Die Herstellung umfangreicher Mutantenbibliotheken erfolgt in diesem Beispiel jedoch durch *in vitro*-Rekombination.

Die für die *in vitro*-Rekombination verwendete DNA wird entweder durch *mutagenisierende PCR* generiert oder durch Vereinigung der DNA aus einer beliebigen Anzahl von Klonen aus einer oder mehreren, durch wiederholte *mutagenisierende PCR* entstandenen Generationen an Klonen gewonnen. Wenn die PCR-Produkte einer *mutagenisierenden PCR* Ausgangspunkt zur Gewinnung von DNA für die *in vitro*-Rekombination waren, wird wie folgt verfahren: Die PCR-Produkte der

mutagenisierenden PCR (siehe Beispiel 1) werden gereinigt, mit den Restriktionsendonucleasen *Apa* I und *Bam*H I geschnitten, in den entsprechend geschnittenen Vektor pMUTS ligiert und anschließend nach *E. coli* JM 109 transformiert. Die Plasmid-DNA aus allen Transformationsklonen wird isoliert. War eine beliebige Anzahl ausgewählter Klone einer oder verschiedener Generationen an Mutantenklonen Ausgangspunkt für die Gewinnung von DNA für die *in vitro*-Rekombination, so wird die Plasmid-DNA des Vektors pMUT5 mit den jeweiligen Varianten des Lipasegens von *P. aeruginosa* isoliert und vereinigt. In beiden Fällen wird wie folgt weiter verfahren: Durch Restriktion mit der Endonuclease *Pvu* II wird ein 1430 Bp großes Fragment gewonnen, das neben dem Strukturgen für die Lipase von *P. aeruginosa* die Bindestellen der schon in der *mutagenisierenden PCR* verwendeten Primer A und B umfaßt. Dieses Fragment wird gereinigt und durch Inkubation mit Desoxyribonuclease I (DNase I aus *Rinder-Pankreas*) in zufällig generierte Fragmente geteilt. Dabei kann die Größe der Fragmente sowie die Fehlerrate der sich anschließenden Reassemblierung durch Wahl der Inkubationsbedingungen beeinflußt werden.

DNase I Behandlung:

In einem Gesamtvolumen von 100 µl werden 3 µg *Pvu* II-Fragmente in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ bzw. 10 mM MnCl₂ und 50 µg/ml BSA für 10-25 min bzw. 1-10 min bei 23 °C mit 0,075 U DNase I inkubiert. Die Reaktion wird durch 10 minütige Inkubation bei 93 °C terminiert. In Abhängigkeit von der Reaktionsdauer entstehen hierbei Fragmente von kleiner 500 Bp bis kleiner 10 Bp. Für den Fall, daß nur ein bestimmter Größenbereich verwendet wird, können diese Fragmente durch selektiven Elektrotransfer auf DEAE-Membran aus Agarosegelen gewonnen werden (nach F.M. Ausubel, *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, 1989). Nach Reinigung der Fragmente durch das Qiagen Nucleotide Removal Kit® (Fa. Qiagen) wird die nachfolgende Reassemblierungsreaktion durchgeführt.

Reassemblierungsreaktion

10-30 ng der aus der DNase I-Restriktion stammenden Fragmente werden in 75 mM Tris/HCl pH 9,0, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% (w/v) Tween 20, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs mit 2U Goldstar Taq-Polymerase (Fa. Eurogentec) in einem Gesamtvolumen von 50 μl folgendem PCR-Programm unterzogen: 2 min 94 °C, 40 Zyklen mit 1 min 94 °C, 2 min 52 °C und 1 min 72 °C abschließend 7 min 72 °C. Die Taq-Polymerase wird nach dem 1 minütigen Denaturierungsschritt des 1. Zyklus zugegeben.

PCR

1 μl aus der Reassemblierungsreaktion wird in eine sich anschließende PCR-Reaktion eingesetzt, die sich mit folgenden Unterschieden, wie für die Reassemblierungsreaktion beschrieben, zusammensetzt: anstelle der DNase I-generierten Fragmente wird 1 μl der Reassemblierungsreaktion als Matrizen-DNA eingesetzt. Zusätzlich werden die Primer A und B in einer Konzentration von 0,2 mM sowie 10 % Dimethylsulfoxid zugesetzt. Das Zyklenprotokoll lautet wie folgt:

2 min 98 °C, 30 Zyklen zu 1 min 94 °C, 2 min 64 °C, 1 min 72 °C und abschließend 7 min 72 °C; Es werden Parallelansätze durchgeführt. Die in diesen Reaktionen entstandenen PCR-Produkte werden gereinigt, mit den Restriktionendonukleasen Apa I und Bam HI restringiert und wie im Abschnitt "mutagenisierende PCR" von Beispiel 1 beschrieben kloniert.

Ergebnisse (*in vitro*-Rekombination):

Es wurden 12 Klone aus der 1. Generation der durch *mutagenisierende PCR* erhaltenen Mutantenbibliothek (siehe Beispiel 1) für die *in vitro*-Rekombination eingesetzt. Folgende Klone, die im Screening-Test verbesserte Enantioselektivität gezeigt hatten, wurden benutzt:

P1B01-A2, P1B01-A6, P1B01-D2, P1B01-D5, P1B01-E1, P1B01-E4, P1B01-F3, P1B01-F11, P1B01-H1, P1B01-H3, P1B01-F12.

Die nach der oben beschriebenen Vorgehensweise rekombinierte DNA dieser Klone wird wie im Abschnitt "mutagenisierende PCR" angegeben kloniert und die Kulturüberstände zum Test auf Enantioselektivität eingesetzt. Es wurden ca. 1000 rekombinante Klone getestet. Die beiden identifizierten Rekombinanten S2A01-E11 und S2A02-G3 zeigen gegenüber der besten Mutante der 1. Generation (P1B01-E4) aus Beispiel 1 eine signifikante Verbesserung der Enantioselektivität.

Tabelle 6

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität (*in vitro*-Rekombination)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nach GC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (ber. nach GC)
S2A01-E11	145,6	41,6	3,5	41,0 / 27,0	2,8
S2A02-G3	210,8	62,0	3,4	38,0 / 23,0	2,5

¹⁾ $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

²⁾ $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Studiengesellschaft Kohle mbH
- (B) STRASSE: Kaiser-Wilhelm-Platz 1
- (C) ORT: Muelheim an der Ruhr
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 45470

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung und Identifizierung neuer Hydrolasen mit verbesserten Eigenschaften

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCGCAATTAA CCCTCACTAA AGGGAACAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCGTAATACG ACTCACTATA GGGCGAA

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC 60

CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TAT CTG CTC CCC CTC 111

Met Lys Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Leu

-26 -25

-20

GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG 159

Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln

-15

-10

-5

GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC 207

Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly

1

5

10

15

ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT 255

Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile

20

25

30

CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC 303

Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val

35

40

45

AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG 351

Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln

50

55

60

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC 399

Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile

65

70

75

GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT 447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg
80 85 90 95

CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ATC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT 495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Ile Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly
100 105 110

TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC 543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly
115 120 125

GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC 591
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser
130 135 140

TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG 639
Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu
145 150 155

GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG .687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro
160 165 170 175

CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC 735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn
180 185 190

GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC 783
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe
195 200 205

CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG 831

Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC	1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala	
-26 -25 -20 -15	

```

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
-10                -5                1                5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
      10                15                20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
      25                30                35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
      40                45                50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
      55                60                65                70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
      75                80                85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
      90                95                100

Ile Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
      105                110                115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
      120                125                130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
      135                140                145                150

Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
      155                160                165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
      170                175                180

```

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC 60

CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC 111

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu

-26 -25

-20

GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG 159

Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln

-15

-10

-5

GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC 207

Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly

1

5

10

15

ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT 255

Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile

20

25

30

CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC 303

Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val

35

40

45

AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG 351

Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln

50

55

60

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTG AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC 399

Val	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	
65						70					75					
GGC	CAC	AGC	CAC	GGC	GGG	CCG	ACC	ATC	CGC	TAC	GTC	GCC	GCC	GTA	CGT	447
Gly	His	Ser	His	Gly	Gly	Pro	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Ala	Ala	Val	Arg	
80					85				90						95	
CCC	GAC	CTG	ATC	GCT	TCC	GCC	ACC	AGC	GTC	GGC	GCC	CCG	CAC	AAG	GGT	495
Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	His	Lys	Gly	
				100					105					110		
TCG	GAC	ACC	GCC	GAC	TTC	CTG	CGC	CAG	ATC	CCA	CCG	GGT	TCG	GCC	GGC	543
Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	
			115					120					125			
GAG	GCA	GTC	CTC	TCC	GGG	CTG	GTC	AAC	AGC	CTC	GGC	GCG	CTG	ATC	AGC	591
Glu	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Ile	Ser	
		130					135					140				
TTC	CTT	TCC	AGC	GGC	GGC	ACC	GGT	ACG	CAG	AAT	TCA	CTG	GGC	TCG	CTG	639
Phe	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Asn	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	
		145					150				155					
TAG	TCG	CTG	AAC	AGC	GAG	GGT	GCC	GCG	CGC	TTC	AAC	GCC	AAG	TAC	CCG	687
Glu	Ser	Leu	Asn	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Ala	Lys	Tyr	Pro	
160					165				170					175		
CAG	GGC	ATC	CCC	ACC	TCG	GCC	TGC	GGC	GAA	GGC	GCC	TAC	AAG	GTC	AAC	735
Gln	Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Ala	Cys	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Lys	Val	Asn	
				180				185				190				
GGC	GTG	AGC	TAT	TAC	TCC	TGG	AGC	GGT	TCC	TCG	CCG	CTG	ACC	AAC	TTC	783
Gly	Val	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Asn	Phe	
		195						200				205				

CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG 831
 Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys
 210 215 220

AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG 879
 Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu
 225 230 235

GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG 927
 Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val
 240 245 250 255

AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC 975
 Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser
 260 265 270

GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG 1017
 Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 275 280 285

TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC 1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 311 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
10 15 20

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
40 45 50

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
75 80 85

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
105 110 115

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
135 140 145 150

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

```

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC      60

CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC      111
      Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu
      -26 -25                               -20

GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG      159
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln
      -15                               -10                               -5

GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC      207
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly
      1                               5                               10                               15

ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT      255
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile
      20                               25                               30

CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC      303
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val
      35                               40                               45

AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG      351
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln
      50                               55                               60

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTG AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC      399

```

Val	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	
65						70					75					
GGC	CAC	AGC	CAC	GGC	GGG	CCG	ACC	ATC	CGC	TAC	GTC	GCC	GCC	GTA	CGT	447
Gly	His	Ser	His	Gly	Gly	Pro	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Ala	Ala	Val	Arg	
80					85					90					95	
CCC	GAC	CTG	ATC	GCT	TCC	GCC	ACC	AGC	GTC	GGC	GCC	CCG	CAC	AAG	GGT	495
Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	His	Lys	Gly	
				100					105					110		
ACG	GAC	ACC	GCC	GAC	TTC	CTG	CGC	CAG	ATC	CCA	CCG	GGT	TCG	GCC	GGC	543
Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	
			115					120					125			
GAG	GCA	GTC	CTC	TCC	GGG	CTG	GTC	AAC	AGC	CTC	GGC	GCG	CTG	ATC	AGC	591
Glu	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Ile	Ser	
	130					135					140					
TTC	CTT	TCC	AGC	GGC	GGC	ACC	GGT	ACG	CAG	AAT	TTA	CTG	GGC	TCG	CTG	639
Phe	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Asn	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	
	145					150					155					
TAG	TCG	CTG	AAC	AGC	GAG	GGT	GCC	GCG	CGC	TTC	AAC	GCC	AAG	TAC	CCG	687
Glu	Ser	Leu	Asn	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Ala	Lys	Tyr	Pro	
160					165					170				175		
CAG	GGC	ATC	CCC	ACC	TCG	GCC	TGC	GGC	GAA	GGC	GCC	TAC	AAG	GTC	AAC	735
Gln	Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Ala	Cys	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Lys	Val	Asn	
				180					185				190			
GGC	GTG	AGC	TAT	TAC	TCC	TGG	AGC	GGT	TCC	TCG	CCG	CTG	ACC	AAC	TTC	783
Gly	Val	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Asn	Phe	
	195							200					205			

CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG	831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC	1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
-26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC 60

CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC 111

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu

-26 -25

-20

GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG 159

Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln

-15

-10

-5

GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC 207

Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly

1

5

10

15

ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT 255

Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile

20

25

30

CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GGC 303

Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly

35

40

45

AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG 351

Ser Gln Leu Asp Thr Ser Gly Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln

50

55

60

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	399
Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile	
65 70 75	
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT	447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg	
80 85 90 95	
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT	495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly	
100 105 110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC	543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly	
115 120 125	
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC	591
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser	
130 135 140	
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TTA CTG GGC TCG CTG	639
Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu	
145 150 155	
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG	687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro	
160 165 170 175	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC	735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn	
180 185 190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC	783

Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe	
195 200 205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG	831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
AGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC	1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1047 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:84..1016

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:162..1016

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGATCCCCGG TTCTCCCGGA AGGATTCGGG CGATGGCTGG CAGGACGCGC CCCTCGGCC 60

CATCAACCTG AGATGAGAAC AAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC 110

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu

-26 -25

-20

GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG 158

Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln

-15

-10

-5

GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC 206

Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly

1

5

10

15

ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT 254

Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile

20

25

30

CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC 302

Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val

35

40

45

AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG 350

Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln

50

55

60

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	398
Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile	
65 70 75	
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT	446
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg	
80 85 90 95	
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT	494
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly	
100 105 110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC	542
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly	
115 120 125	
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC	590
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser	
130 135 140	
TTC CTT TCC AGC GGC AGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG	638
Phe Leu Ser Ser Gly Ser Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu	
145 150 155	
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG	686
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro	
160 165 170 175	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC	734
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn	
180 185 190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC	782

Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe	
195 200 205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG	830
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys	
210 215 220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG	878
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu	
225 230 235	
AGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG	926
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val	
240 245 250 255	
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC	974
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser	
260 265 270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG	1016
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu	
275 280 285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC C	1047

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 311 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Ser Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Stereo- oder Regioselektivität, katalytischer Aktivität oder Stabilität, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) ein Ausgangs-Hydrolasegen mittels einer modifizierten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mutagenisiert wird, wobei durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotid-Konzentrationen sowie der Einstellung der Zyklenanzahl die Mutationsfrequenz und Gesamtanzahl der Mutationen in der amplifizierten DNA eingestellt wird und/oder
- b) ein oder mehrere Ausgangs-Hydrolasegene, ein oder mehrere gemäß Schritt a) mutierte Hydrolasegene oder Gemische von einem oder mehreren Ausgangs-Hydrolasegenen und einem oder mehreren gemäß Schritt a) mutierten Hydrolasegenen durch enzymatische Fragmentierung dieser Gene und nachfolgender enzymatischer Reassemblierung der entstandenen Fragmente zu vollständig rekombinierten Hydrolasegenen mutagenisiert werden,
- c) die gemäß Schritt a) oder b) erhaltenen mutierten Hydrolasegene in einen Wirtsorganismus transformiert werden und
- d) Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften, die von in Schritt c) erhaltenen Transformanten exprimiert werden, durch ein Testverfahren identifiziert werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt a) bei der PCR durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotid-Konzentration eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 1-2 Basenaustauschen bezogen auf das zu mutagenisierende Hydrolasegen eingestellt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt a) als Ausgangs-Hydrolasegen ein in einer zuvor gemäß Anspruch 1 durchgeführten PCR mutagenisiertes Hydrolasegen eingesetzt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die enzymatische Fragmentierung der Hydrolasegene mit einer Desoxyribonuclease durchgeführt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die Reassemblierung der Fragmente enzymatisch mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Verwendung eines zyklischen Temperaturprogrammes, in welchem die Parameter Temperatur und Zyklendauer eingestellt werden, durchgeführt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) während der enzymatischen Reassemblierung durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotidkonzentration die Mutationsfrequenz eingestellt wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die vollständig rekombinierten Hydrolasegene nach Beendigung der Reassemblierungsreaktion durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) entweder aus Schritt a) gemäß Anspruch 1 oder 2 erhaltene modifizierte Hydrolasegene oder mehrere gemäß Anspruch 3 mutagenisierte Hydrolasegene der Fragmentierung und Reassemblierung unterworfen werden.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) zur Reassemblierung zusätzlich synthetisch hergestellte Genfragmente eingesetzt werden.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) zur Reassemblierung Hydrolasegen-Fragmente aus unterschiedlichen Organismen eingesetzt werden können, die eine Sequenzhomologie von mindestens 60% zueinander besitzen.
11. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 6, wobei die Hydrolase-Mutanten Lipase- oder Esterasemutanten sind und die Konzentration der Magnesium-Ionen 1,5 bis 8,0 mM, bevorzugt 5,8 bis 6,4 mM ist und die Konzentration der Mangan-Ionen 0,0 bis 3,0 mM, bevorzugt $< 0,3$ mM ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 6, wobei die Hydrolase-Mutanten Lipase- oder Esterasemutanten sind und die Konzentration der Desoxynucleotidtriphosphate 0,05 mM bis 1,0 mM, bevorzugt 0,2 mM beträgt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) zum Test auf Stereo- oder Regioselektivität der Hydrolase-Mutanten ein Testsubstrat mit einer chromophoren Gruppe versehen ist, die nach der Abspaltung durch den Katalysator eine Änderung der Absorption oder Emission hervorruft, die spektrometrisch bestimmt wird und die reinen Stereo- oder Regioisomeren des Testsubstrates in getrennten Testgefäßen mit gleichen Mengen der Hydrolase-Mutanten versetzt werden und die Stereo- oder Regioselektivität aus dem Verhältnis der erhaltenen linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bestimmt werden kann.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei als Testsubstrat die Stereo- oder Regioisomeren einer Verbindung mit einer über eine Carbonsäureester- oder Carbonsäureamid-Bindung gebundene, UV/VIS-aktive oder fluoreszenzaktive Molekülgruppe eingesetzt werden.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei die UV/VIS-aktive Molekülgruppe ein p-Nitrophenyl-Rest ist.

16. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereo- oder Regioselektivität über die Bestimmung der zeitlichen Konzentrationsänderung von freien Fettsäuren oder Bernsteinsäure erfolgt, wobei die entsprechenden stereo- oder regioisomeren Carbonsäureester oder -amide mit Hilfe der Hydrolase-Mutanten in getrennten Gefäßen zu freien Fettsäuren oder Bernsteinsäure hydrolysiert werden.

17. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereo- oder Regioselektivität über die Messung der Radioaktivität erfolgt, wobei die Hydrolase-Mutanten mit in einer funktionellen Gruppe unterschiedlich radioaktiv markierten Stereo- oder Regioisomeren umgesetzt werden und wobei das Gemisch der Stereo- oder Regioisomeren trägerfixiert ist.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, wobei eines der Stereo- oder Regioisomere des an den Träger gebundenen Gemisches der isomeren Verbindung mit dem Radioisotop ^3H und das andere Stereoisomer mit dem Radioisotop ^{14}C markiert ist.

19. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereoselektivität über die kapillarelektrophoretische Bestimmung der Reaktionsprodukte und -edukte einer Testreaktion erfolgt, wobei die Trennung der stereoisomeren Reaktionsprodukte und -edukte in chiral-modifizierten Kapillaren durchgeführt wird.

20. Verfahren gemäß Anspruch 13 bis 19, wobei mehrere Reaktionen parallel in Mikrotiterplatten durchgeführt werden.

21. Hydrolase-Mutanten erhältlich durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 20.

22. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 21, die Lipase-Mutanten sind.

23. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 21, die Esterase-Mutanten sind.

24. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 22, die Lipase-Mutanten der Ausgangs-Lipase aus dem Stamm *P. aeruginosa* sind.

25. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 24, die durch Exprimieren der Transormanten P1B 01-E4 (DSM 11658), P2B 08-H3 (DSM 11659) oder P3B 13-D10 (DSM 11660) erhältlich ist.

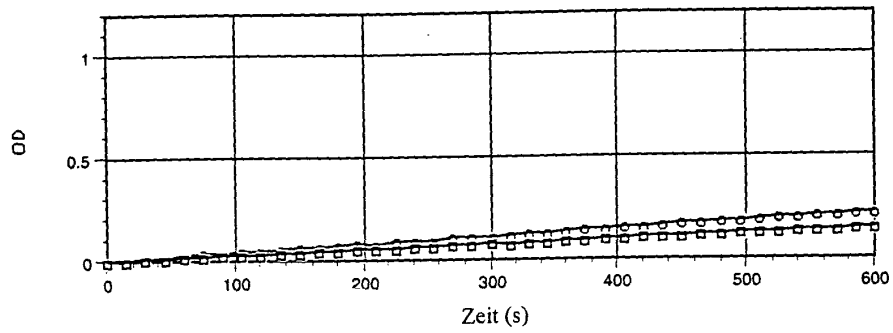
26. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 24, die die Aminosäuresequenz der in SEQ ID NOs 4, 6, 8 und 10 gezeigten reifen Proteine aufweisen.

27. Verfahren zum Test von Katalysatoren auf Stereo- oder Regioselektivität, wobei ein Testsubstrat mit einer chromophoren Gruppe versehen ist, die nach der Abspaltung durch den Katalysator eine Änderung

der Absorption oder Emission hervorruft, die spektrometrisch bestimmt wird und die reinen Stereo- oder Regioisomeren des Testsubstrates in getrennten Testgefäßen mit gleichen Mengen des Katalysators versetzt werden und die Stereo- oder Regioselektivität aus dem Verhältnis der erhaltenen linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bestimmt werden kann.

Zusammenfassung:

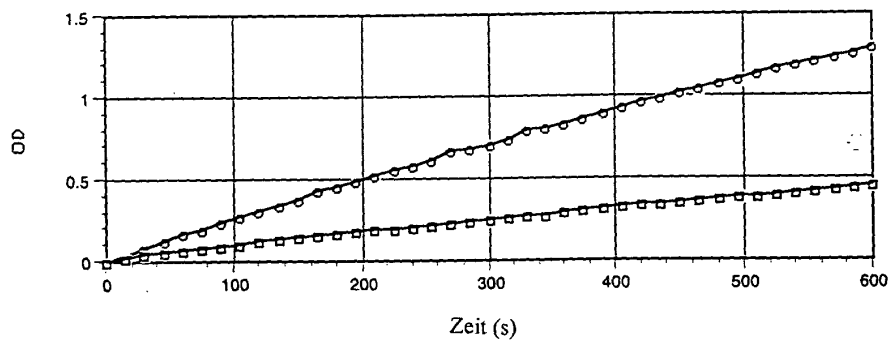
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.

Fig. 1Wildtyp

$$V_{app}(S) = 21,8$$

$$V_{app}(R) = 14,9$$

$$E_{app} = 1,5$$

P1B01-E4

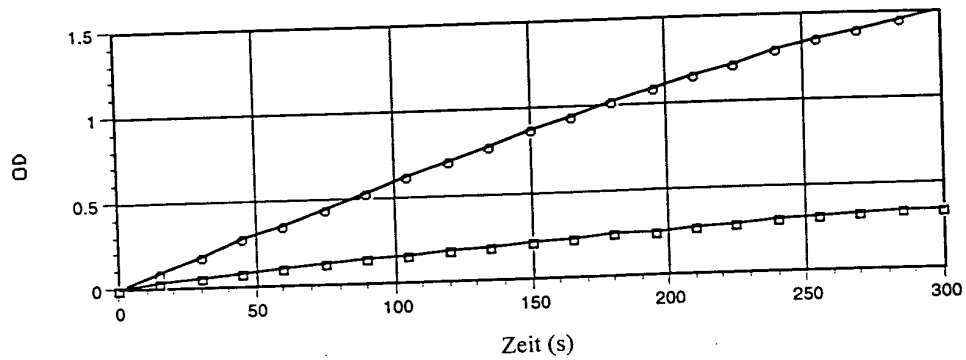
$$V_{app}(S) = 128,4$$

$$V_{app}(R) = 43,2$$

$$E_{app} = 3,0$$

1/2

P2B08-H3

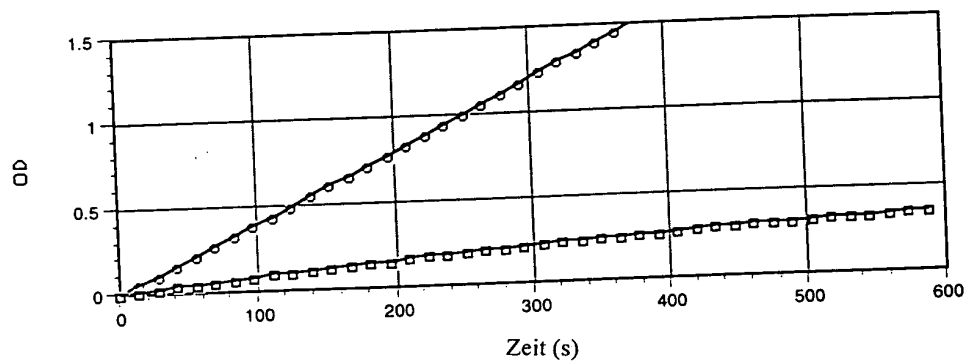


$$V_{app}(S) = 310,8$$

$$V_{app}(R) = 67,4$$

$$E_{app} = 4,6$$

P3B13-D10



$$V_{app}(S) = 241,1$$

$$V_{app}(R) = 35,2$$

$$E_{app} = 6,9$$

Fig. 2

10	20	30	
G G A T C C C C	G G T T C T C C C G G A A G G A T T C G G	01-H1	
G G A T C C C C	G G T T C T C C C G G A A G G A T T C G G	01-E4	
G G A T C C C C	G G T T C T C C C G G A A G G A T T C G G	08-H3	
G G A T C C C C	G G T T C T C C C G G A A G G A T T C G G	13-D10	
G G A T C C C C	G G T T C T C C C G G A A G G A T T C G G	WT	
40	50	60	
G C G A T G G C T G G C A G G A C G C G C C C C T C G G C C	01-H1		
G C G A T G G C T G G C A G G A C G C G C C C C T C G G C C	01-E4		
G C G A T G G C T G G C A G G A C G C G C C C C T C G G C C	08-H3		
G C G A T G G C T G G C A G G A C G C G C C C C T C G G C C	13-D10		
G C G A T G G C T G G C A G G A C G C G C C C C T C G G C C	WT		
70	80	r start	90
C C A T C A A C C T G A G A T G A G A A C A A C A T G A A G	01-H1		
C C A T C A A C C T G A G A T G A G A A C A A C A T G A A G	01-E4		
C C A T C A A C C T G A G A T G A G A A C A A C A T G A A G	08-H3		
C C A T C A A C C T G A G A T G A G A A C A A C A T G A A G	13-D10		
C C A T C A A C C T G A G A T G A G A A C A A C A T G A A G	WT		
100	110	r	
A A G A A G T C T C T G C T C C C C T C G G C C T G G C C	01-H1		
A A G A A G T C T C T G C T C C C C T C G G C C T G G C C	01-E4		
A A G A A G T C T C T G C T C C C C T C G G C C T G G C C	08-H3		
A A G A A G T C T C T G C T C C C C T C G G C C T G G C C	13-D10		
A A G A A G T C T C T G C T C C C C T C G G C C T G G C C	WT		
130	140	150	
A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C T G C C A G C C C T	01-H1		
A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C T G C C A G C C C T	01-E4		
A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C T G C C A G C C C T	08-H3		
A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C T G C C A G C C C T	13-D10		
A T C G G T C T C G C C T C T C T C G C T G C C A G C C C T	WT		
160	170	180	
C T G A T C C A G G C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	01-H1		
C T G A T C C A G G C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	01-E4		
C T G A T C C A G G C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	08-H3		
C T G A T C C A G G C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	13-D10		
C T G A T C C A G G C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	WT		

190	200	210	
AAATACCCCATCGTGCTGGCCCAACGGCATG			01-H1
AAATACCCCATCGTGCTGGCCCAACGGCATG			01-E4
AAATACCCCATCGTGCTGGCCCAACGGCATG			08-H3
AAATACCCCATCGTGCTGGCCCAACGGCATG			13-D10
AAATACCCCATCGTGCTGGCCCAACGGCATG			WT

220	230	240	
CTCGGCTTCGACAAACATCCTCGGGGTTCGAC			01-H1
CTCGGCTTCGACAAACATCCTCGGGGTTCGAC			01-E4
CTCGGCTTCGACAAACATCCTCGGGGTTCGAC			08-H3
CTCGGCTTCGACAAACATCCTCGGGGTTCGAC			13-D10
CTCGGCTTCGACAAACATCCTCGGGGTTCGAC			WT

250	260	270	
TACTGGTTCGGGCATTCCAGCGCCTTGC GC			01-H1
TACTGGTTCGGGCATTCCAGCGCCTTGC GC			01-E4
TACTGGTTCGGGCATTCCAGCGCCTTGC GC			08-H3
TACTGGTTCGGGCATTCCAGCGCCTTGC GC			13-D10
TACTGGTTCGGGCATTCCAGCGCCTTGC GC			WT

280	290	300	
CGTGACGGGTGCCCAAGGTCTACGTCACCGAA			01-H1
CGTGACGGGTGCCCAAGGTCTACGTCACCGAA			01-E4
CGTGACGGGTGCCCAAGGTCTACGTCACCGAA			08-H3
CGTGACGGGTGCCCAAGGTCTACGTCACCGAA			13-D10
CGTGACGGGTGCCCAAGGTCTACGTCACCGAA			WT

310	320	330	
GTCAGCCAGTTGGACACCTCGGGAAGTCCGC			01-H1
GTCAGCCAGTTGGACACCTCGGGAAGTCCGC			01-E4
GTCAGCCAGTTGGACACCTCGGGAAGTCCGC			08-H3
GTCAGCCAGTTGGACACCTCGGGAAGTCCGC			13-D10
GTCAGCCAGTTGGACACCTCGGGAAGTCCGC			WT

340	350	360	
GGCGAGCAGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAA			01-H1
GGCGAGCAGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAA			01-E4
GGCGAGCAGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAA			08-H3
GGCGAGCAGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAA			13-D10
GGCGAGCAGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAA			WT

370	380	390	
A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A G C C C A A G G T C			01-H1
A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A G C C C A A G G T C			01-E4
A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A G C C C A A G G T C			08-H3
A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A G C C C A A G G T C			13-D10
A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A G C C C A A G G T C			WT

400	410	420	
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G			01-H1
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G			01-E4
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G			08-H3
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G			13-D10
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G			WT

430	440	450	
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			01-H1
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			01-E4
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			08-H3
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			13-D10
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			WT

460	470	480	
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			01-H1
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			01-E4
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			08-H3
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			13-D10
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			WT

490	500	510	
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G C C G A C			01-H1
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G C C G A C			01-E4
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G C C G A C			08-H3
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G C C G A C			13-D10
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G C C G A C			WT

520	530	540	
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			01-H1
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			01-E4
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			08-H3
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			13-D10
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			WT

550	560	570	
GGCGAGGCA	GTCTCTCCGGG	CTGGTCAAC	01-H1
GGCGAGGCA	GTCTCTCCGGG	CTGGTCAAC	01-E4
GGCGAGGCA	GTCTCTCCGGG	CTGGTCAAC	08-H3
GGCGAGGCA	GTCTCTCCGGG	CTGGTCAAC	13-D10
GGCGAGGCA	GTCTCTCCGGG	CTGGTCAAC	WT

580	590	600	
AGCCTCGGC	CGCGCTGATC	AGCTTCTTTCC	01-H1
AGCCTCGGC	CGCGCTGATC	AGCTTCTTTCC	01-E4
AGCCTCGGC	CGCGCTGATC	AGCTTCTTTCC	08-H3
AGCCTCGGC	CGCGCTGATC	AGCTTCTTTCC	13-D10
AGCCTCGGC	CGCGCTGATC	AGCTTCTTTCC	WT

610	620	630		
AGCGGC	GGCACC	GGGTACGCGAGAA	TTCACTG	01-H1
AGCGGC	GGCACC	GGGTACGCGAGAA	TTCACTG	01-E4
AGCGGC	GGCACC	GGGTACGCGAGAA	TTCACTG	08-H3
AGCGGC	GGCACC	GGGTACGCGAGAA	TTCACTG	13-D10
AGCGGC	GGCACC	GGGTACGCGAGAA	TTCACTG	WT

640	650	660		
GGCTCGCT	GGAGTCGCT	GAAACAGCGAGGG	T	01-H1
GGCTCGCT	GGAGTCGCT	GAAACAGCGAGGG	T	01-E4
GGCTCGCT	GGAGTCGCT	GAAACAGCGAGGG	T	08-H3
GGCTCGCT	GGAGTCGCT	GAAACAGCGAGGG	T	13-D10
GGCTCGCT	GGAGTCGCT	GAAACAGCGAGGG	T	WT

670	680	690		
GCCGCGCGC	TTTCAACG	CCCAAGTACCC	CGCAG	01-H1
GCCGCGCGC	TTTCAACG	CCCAAGTACCC	CGCAG	01-E4
GCCGCGCGC	TTTCAACG	CCCAAGTACCC	CGCAG	08-H3
GCCGCGCGC	TTTCAACG	CCCAAGTACCC	CGCAG	13-D10
GCCGCGCGC	TTTCAACG	CCCAAGTACCC	CGCAG	WT

700	710	720	
GGCATCCCC	ACCTCGGC	CTGCGGCGAAGGC	01-H1
GGCATCCCC	ACCTCGGC	CTGCGGCGAAGGC	01-E4
GGCATCCCC	ACCTCGGC	CTGCGGCGAAGGC	08-H3
GGCATCCCC	ACCTCGGC	CTGCGGCGAAGGC	13-D10
GGCATCCCC	ACCTCGGC	CTGCGGCGAAGGC	WT

730	740	750
GCCTACAAGGTCAACGGCGTGAGCTATTAC		01-H1
GCCTACAAGGTCAACGGCGTGAGCTATTAC		01-E4
GCCTACAAGGTCAACGGCGTGAGCTATTAC		08-H3
GCCTACAAGGTCAACGGCGTGAGCTATTAC		13-D10
GCCTACAAGGTCAACGGCGTGAGCTATTAC		WT

760	770	780
TCCTGGAGCGGTTTCCTCGCCGCTGACCAAC		01-H1
TCCTGGAGCGGTTTCCTCGCCGCTGACCAAC		01-E4
TCCTGGAGCGGTTTCCTCGCCGCTGACCAAC		08-H3
TCCTGGAGCGGTTTCCTCGCCGCTGACCAAC		13-D10
TCCTGGAGCGGTTTCCTCGCCGCTGACCAAC		WT

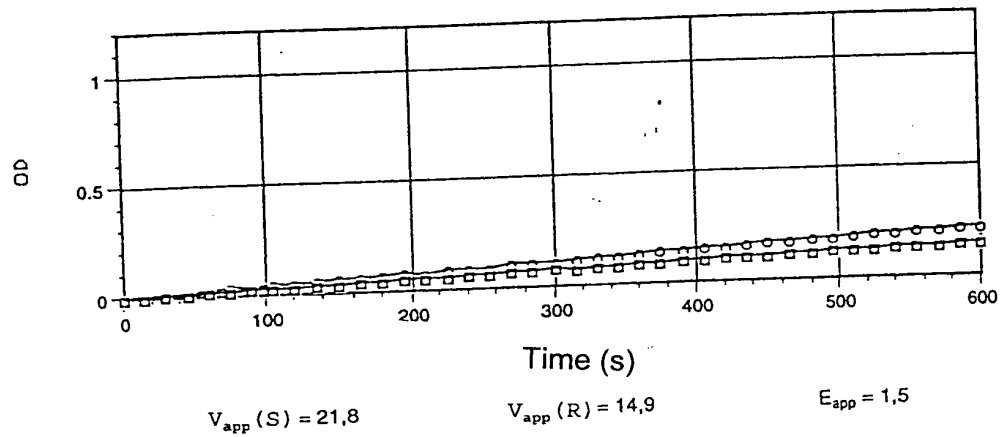
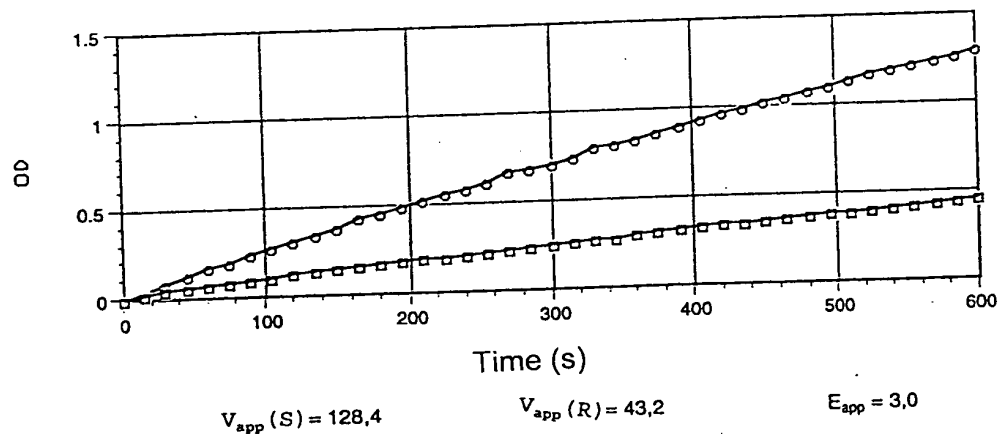
790	800	810
TTCCTCGATCCGAGCGACGCCCTTCCTCGGC		01-H1
TTCCTCGATCCGAGCGACGCCCTTCCTCGGC		01-E4
TTCCTCGATCCGAGCGACGCCCTTCCTCGGC		08-H3
TTCCTCGATCCGAGCGACGCCCTTCCTCGGC		13-D10
TTCCTCGATCCGAGCGACGCCCTTCCTCGGC		WT

820	830	840
GCCTCGTTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACC		01-H1
GCCTCGTTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACC		01-E4
GCCTCGTTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACC		08-H3
GCCTCGTTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACC		13-D10
GCCTCGTTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACC		WT

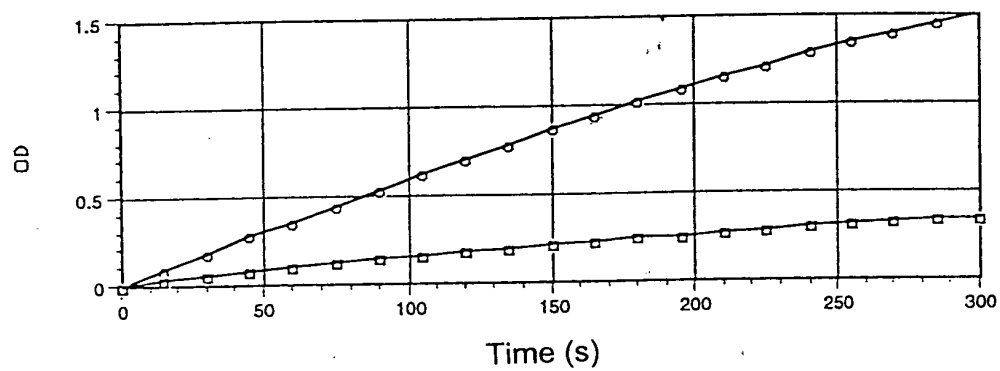
850	860	870
GCCAACGACGGCCCTGGTTCGGCACCTGCAGT		01-H1
GCCAACGACGGCCCTGGTTCGGCACCTGCAGT		01-E4
GCCAACGACGGCCCTGGTTCGGCACCTGCAGT		08-H3
GCCAACGACGGCCCTGGTTCGGCACCTGCAGT		13-D10
GCCAACGACGGCCCTGGTTCGGCACCTGCAGT		WT

880	890	900
TCGCACCTGGGGCATGGTGTATCCGCGACAAC		01-H1
TCGCACCTGGGGCATGGTGTATCCGCGACAAC		01-E4
TCGCACCTGGGGCATGGTGTATCCGCGACAAC		08-H3
TCGCACCTGGGGCATGGTGTATCCGCGACAAC		13-D10
TCGCACCTGGGGCATGGTGTATCCGCGACAAC		WT

910	920	930	
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			01-H1
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			01-E4
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			08-H3
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			13-D10
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			WT
940	950	960	
C A G G T C T T C G G C C T C A C C A G C C T G T T C G A G			01-H1
C A G G T C T T C G G C C T C A C C A G C C T G T T C G A G			01-E4
C A G G T C T T C G G C C T C A C C A G C C T G T T C G A G			08-H3
C A G G T C T T C G G C C T C A C C A G C C T G T T C G A G			13-D10
C A G G T C T T C G G C C T C A C C A G C C T G T T C G A G			WT
970	980	990	
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			01-H1
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			01-E4
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			08-H3
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			13-D10
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			WT
1000	1010	stop 1020	
G C C A A C C G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			01-H1
G C C A A C C G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			01-E4
G C C A A C C G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			08-H3
G C C A A C C G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			13-D10
G C C A A C C G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			WT
1030	1040		
G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G C C C G G G C C C			01-H1
G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G C C C G G G C C C			01-E4
G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G C C C G G G C C C			08-H3
G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G C C C G G G C C C			13-D10
G A C C C C G G C C G G G G C C T C G G C C C G G G C C C			WT

Fig. 1Wild typeP1B 01-E4

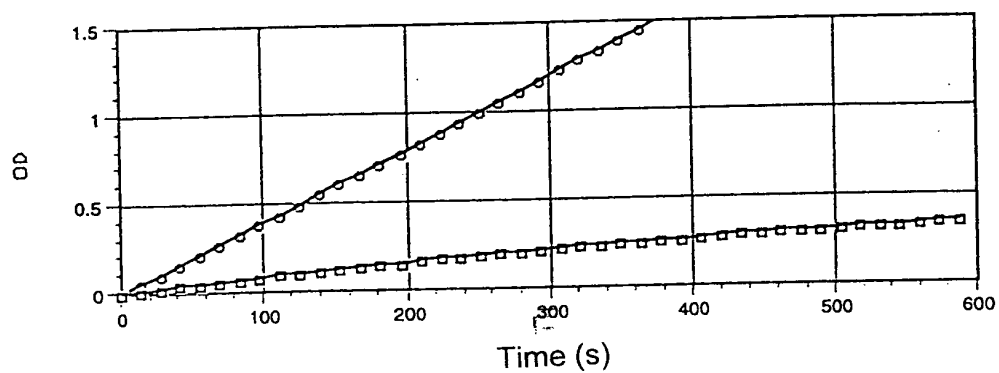
2/13

P2B 08-H3

$V_{app}(S) = 310,8$

$V_{app}(R) = 67,4$

$E_{app} = 4,6$

P3B 13-D10

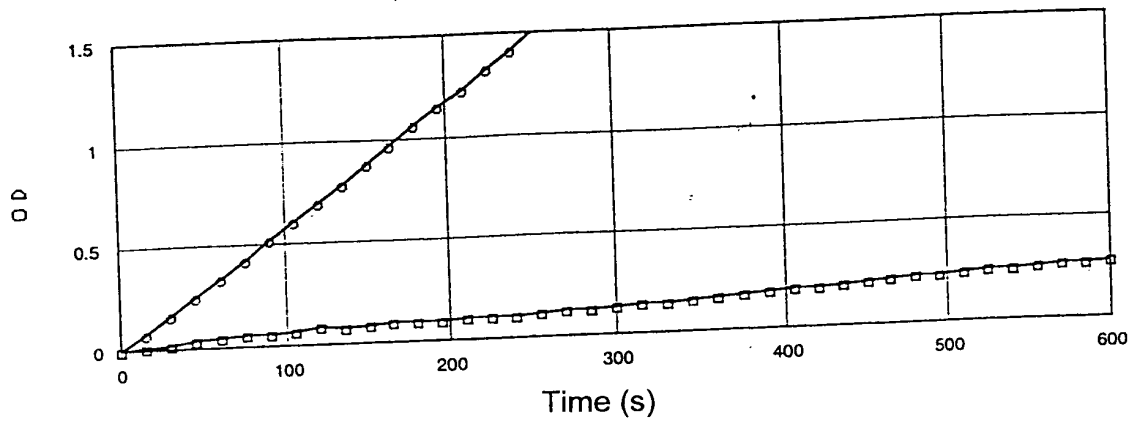
$V_{app}(S) = 241,1$

$V_{app}(R) = 35,2$

$E_{app} = 6,9$

3/13

P4B 04-H3

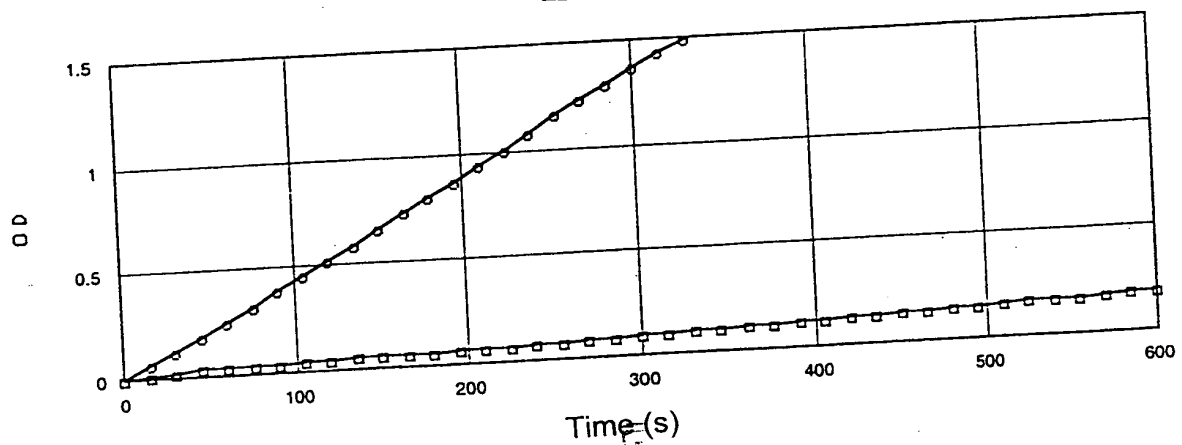


$$V_{app}(S) = 355,6$$

$$V_{app}(R) = 26,5$$

$$E_{app} = 13,4$$

P5B 14-C11

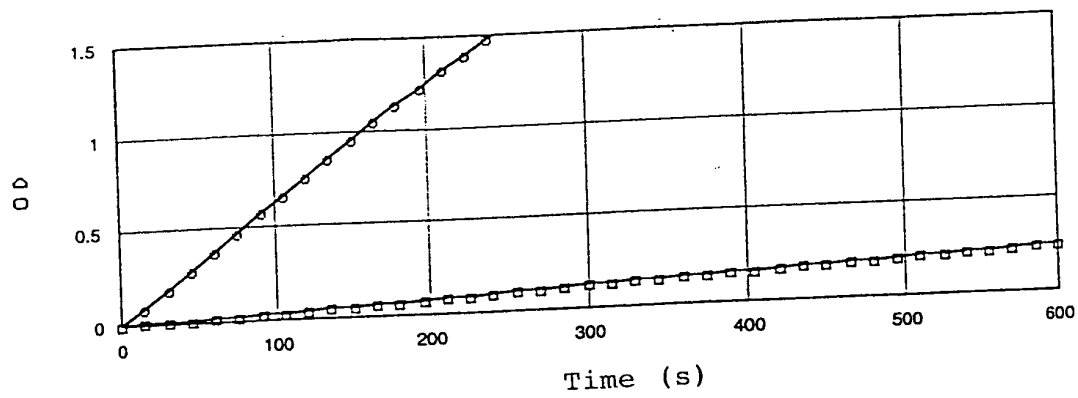


$$V_{app}(S) = 275,9$$

$$V_{app}(R) = 17,3$$

$$E_{app} = 15,9$$

4/13

P4BSF 03-G10 $V_{app}(S) = 384,7$ $V_{app}(R) = 25,3$ $E_{app} = 15,2$

DATE: 09/02/2014

[illegible][illegible][illegible][illegible]

80	90																
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	T	C	99
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	A	C	C	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	T	T	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	C	C	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	T	C	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	T	T	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	C	C	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	T	T	100
C	A	A	C	A	T	G	A	A	G	A	A	G	T	C	C	C	100

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

300													310													
G	T	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	319						
G	T	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						
G	T	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						
G	T	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						
G	G	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						
G	G	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						
G	G	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						
G	G	C	A	G	C	C	A	G	T	T	G	G	A	C	A	C	C	T	C	320						

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

													480														490													
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	499																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																
G	C	C	C	C	C	G	C	C	A	C	A	A	A	G	G	G	G	T	T	C	G	G	A	500																

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
PSB 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

10/13

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

620										630										
G	A	A	T	T	C	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	639
G	A	A	T	T	C	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640
G	A	A	T	T	C	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640
G	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640
G	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640
G	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640
G	A	A	T	T	T	A	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640
G	A	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	C	T	C	G	C	T	G	G	640

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

11/13

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

920										930										
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	T	T	C	G	939
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	T	T	C	G	940
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	T	T	C	G	940
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	T	T	C	G	940
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	T	T	C	G	940
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	T	T	C	G	940
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	C	T	C	G	940
C	G	A	G	G	T	G	A	A	C	C	A	G	G	T	C	C	T	C	G	940

Wild type

P1B 01-H1
P1B 01-E4
P2B 08-H3
P3B 13-D10
P4B 04-H3
P5B 14-C11
P4BSF 03-G10

[illegible]

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]